

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

Rec'd PCT/PTO

09 FEB 2005

(43) 国際公開日
2004 年 3 月 11 日 (11.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/019966 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 38/00, 9/08, A61J 1/00 (74) 代理人: 社本 一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号新大手町ビル206区ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010754
- (22) 国際出願日: 2003 年 8 月 26 日 (26.08.2003) (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-247298 2002 年 8 月 27 日 (27.08.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 谷川 雅彦 (TANIKAWA, Masahiko) [JP/JP]; 〒171-8545 東京都豊島区高田3丁目41番8号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP). 大村 武史 (OMURA, Takeshi) [JP/JP]; 〒171-8545 東京都豊島区高田3丁目41番8号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF STABILIZING PROTEIN SOLUTION PREPARATION

(54) 発明の名称: タンパク質溶液製剤の安定化方法

(57) Abstract: A method of enhancing the stability of protein solution preparations through inhibition of aggregate formation in a solution of physiologically active protein such as an antibody, an enzyme, a hormone or a cytokine. In particular, a method of stabilizing protein solution preparations, comprising storing the protein solution preparations under magnetic force lines; and a container for accommodating protein solution preparations, which comprises a magnetic force line generator.

(57) 要約: 課題: 抗体、酵素、ホルモン、サイトカイン等の生理活性を有するタンパク質の溶液状態における会合体の生成を抑制し、タンパク質溶液製剤の安定性を向上させる方法を提供する。 解決手段: 磁力線下にタンパク質溶液製剤を保存することを含むタンパク質溶液製剤の安定化方法及び磁力線発生装置を備えたタンパク質溶液製剤の収納容器。

WO 2004/019966 A1

明細書

タンパク質溶液製剤の安定化方法

技術分野

本発明は、タンパク質溶液製剤の安定化方法及びタンパク質溶液製剤の収納容器に関する。さらに詳しくは、磁力線下にタンパク質溶液製剤を保存することにより生理活性タンパク質製剤を安定化する方法及び磁力線発生装置を備えたタンパク質溶液製剤の収納容器に関する。本発明の方法及び収納容器は生理活性タンパク質の会合を抑制し、タンパク質溶液製剤の安定化に特に有用である。

10 背景技術

遺伝子組換え技術の発達によって、種々の生理活性タンパク質製剤が安定した供給量で提供されるようになった。これらの生理活性タンパク質の多くは水溶液中で会合することが知られており、これが製剤の安定性低下の主たる要因になっている。そこで、これらの製剤の安定性を確保するため、凍結乾燥製剤とするか、あるいは安定性を向上させるための各種添加剤を加えたタンパク質溶液製剤の形で提供されている。

たとえば、安定化剤としてヒト血清アルブミンあるいは精製ゼラチンなどのタンパク質といった高分子類或いはポリオール類、アミノ酸及び界面活性剤等といった低分子類を添加することによる安定化効果が見出されている。しかしながら、タンパク質のような生体由来の高分子を安定化剤として添加することは、その安定化剤に由来するウイルス等のコンタミを除去するために非常に煩雑な工程を必要とするなどの問題があった。また、ウイルスの不活性化を目的として加熱処理を行うときに、熱ストレスによりさらに会合、凝集などの問題を生じることがあった。

そこで、添加する安定化剤をなるべく少なくし、かつ簡便な処理によりタンパク質分子の会合を抑制できるタンパク質溶液製剤の安定化方法が求められている。

本発明の目的は、抗体、酵素、ホルモン、サイトカイン等の生理活性を有するタンパク質などの溶液状態における会合体の生成を抑制し、タンパク質溶液製剤の安定性を向上させる方法を提供することである。

発明の開示

上記目的を達成するために鋭意研究した結果、本発明者らは、意外にもタンパク質溶液製剤を磁力線下におくことにより二量体などの会合体の生成を顕著に抑制できることを発見して本発明を完成した。

すなわち、本発明は以下のものを提供する：

(1) 磁力線下にタンパク質溶液製剤を保存することを含むタンパク質溶液製剤の安定化方法。

(2) 磁束密度が1ミリテスラ以上である前記(1)記載の方法。

10 (3) タンパク質が生理活性タンパク質である前記(1)又は(2)記載の方法。

(4) 生理活性タンパク質が、抗体、酵素、サイトカイン、ホルモンから選択される前記(3)記載の方法。

(5) 生理活性タンパク質が造血因子である前記(4)記載の方法。

15 (6) 造血因子がエリスロポエチン又は顆粒球コロニー刺激因子である前記(5)記載の方法。

(7) 生理活性タンパク質が抗体である前記(4)記載の方法。

(8) タンパク質溶液製剤がプレフィルドシリンジである前記(1)記載の安定化方法。

(9) 磁力線発生装置を備えたタンパク質溶液製剤の収納容器。

20 (10) 磁力線発生装置が磁石である前記(9)記載の収納容器。

(11) 磁力線下にタンパク質含有溶液を保存することを含むタンパク質含有溶液の安定化方法。

(12) タンパク質含有溶液がタンパク質製造バルク溶液である前記(11)記載の方法。

25 (13) 磁力線下に保存したタンパク質バルク製造溶液から調製した安定化タンパク質製剤。

(14) 安定化タンパク質製剤が溶液製剤である前記(13)記載の製剤。

(15) 安定化タンパク質製剤が凍結乾燥製剤である前記(13)記載の製剤。

(16) 磁力線下にタンパク質溶液製剤を保存することを含むタンパク質溶液製

剤の会合体生成抑制方法。

(17) タンパク質溶液製剤の安定化のための磁力線発生装置の使用。

図面の簡単な説明

5 図1は、磁力線下におけるEPO注射製剤の加速試験を示す模式図である。

図2は、本発明の方法で溶液製剤を保存する1態様である。aは側面図、bは上面図である。

図3は、本発明の方法で溶液製剤を保存する1態様の側面図である。

図4は、磁力線下にてG-CSF溶液を保存する1態様である。

10

発明を実施するための最良の形態

本発明におけるタンパク質としては生理活性タンパク質が好ましいがこれに限定されない。本発明のタンパク質溶液は医薬品に限らず、食品、化粧品などに含有されるタンパク質の安定化が求められる全てのタンパク質含有溶液の安定化方法を提供する。生理活性タンパク質は、抗体、酵素、サイトカイン、ホルモンを含むがこれに限定されない。具体的には、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、エリスロポエチン(EPO)、トロンボポエチン等の造血因子、インターフェロン、IL-1やIL-6等のサイトカイン、モノクローナル抗体やヒト型化抗体等の免疫グロブリン、組織プラスミノゲン活性化因子(TPA)、ウロキナーゼ、血清アルブミン、血液凝固第VII因子、レプチン、インシュリン、幹細胞成長因子(SCF)などを含むが、これらに限定されない。生理活性タンパク質の中でも、EPO、G-CSF、GM-CSF、トロンボポエチン等の造血因子が好ましく、さらに好ましくはEPO、G-CSFである。また、生理活性タンパク質としては免疫グロブリンが好ましく、さらに好ましくはモノクローナル抗体、ヒト型化抗体である。

25

本発明の安定化方法に用いる生理活性タンパク質とは、哺乳動物、特にヒトの生理活性タンパク質と実質的に同じ生物学的活性を有するものであり、天然由来のもの、および遺伝子組換え法により得られたものを含むが、好ましいのは遺伝子組換え法により得られたものである。遺伝子組換え法による生理活性タンパク

質は、大腸菌などの細菌類；イースト菌；チャイニーズハムスター卵巢（CHO）細胞、C127細胞、COS細胞などの動物由来の培養細胞などに産生せしめ、種々の方法で抽出し分離精製したものが用いられる。遺伝子組換え法によって得られるタンパク質には天然タンパク質とアミノ酸配列が同じであるもの、あるいは該アミノ酸配列の1又は複数を欠失、置換、付加したもので前記生物学的活性を有するものを含む。さらには、タンパク質はPEG等により化学修飾されたものも含む。

生理活性タンパク質としては、例えば糖鎖を有するタンパク質が挙げられる。糖鎖の由来としては、特に制限はないが、哺乳動物細胞に付加される糖鎖が好ましい。哺乳動物細胞には、例えば、チャイニーズハムスター卵巢細胞（CHO細胞）、BHK細胞、COS細胞、ヒト由来の細胞等があるが、この中でも、CHO細胞が最も好ましい。

例えば、生理活性タンパク質がG-CSFである場合には、G-CSFは高純度に精製されたG-CSFであれば全て使用できる。本発明におけるG-CSFは、いかなる方法で製造されたものでもよく、ヒト腫瘍細胞の細胞株を培養し、これから種々の方法で抽出し分離精製したもの、あるいは遺伝子工学的手法により大腸菌などの細菌類；イースト菌；チャイニーズハムスター卵巢（CHO）細胞、C127細胞、COS細胞などの動物由来の培養細胞などに産生せしめ、種々の方法で抽出し分離精製したものが用いられる。好ましくは大腸菌、イースト菌又はCHO細胞によって遺伝子組換え法を用いて生産されたものである。最も好ましくはCHO細胞によって遺伝子組換え法を用いて生産されたものである。さらには、PEG等により化学修飾されたG-CSFも含む（国際特許出願公開番号WO90/12874参照）。

また、生理活性タンパク質がEPOである場合には、EPOはいかなる方法で製造されたものでもよく、ヒト尿より種々の方法で抽出し、分離精製したもの、遺伝子工学的手法（例えば特開昭61-12288号）によりチャイニーズハムスター卵巢細胞（CHO）、BHK細胞、COS細胞、ヒト由来の細胞などに産生せしめ、種々の方法で抽出し分離精製したものが用いられる。さらには、PEG等により化学修飾されたEPOも含む（国際特許出願公開番号WO90/12

874参照)。さらに、糖鎖のついていないEPOをPEG等により化学修飾したものも含む。また、EPOのアミノ酸配列中のN-結合炭水化物鎖結合部位もしくはO-結合炭水化物鎖結合部位において、1以上のグリコシル化部位の数を増加させるように改変したEPO類似体も含む(例えば、特開平8-15139
5 8号、特表平8-506023号参照)。さらには、糖鎖結合部位の数は変化させずに、シアル酸等の含量を増加させることにより糖鎖の量を増加させたものであってもよい。

生理活性タンパク質がモノクローナル抗体である場合には、モノクローナル抗体はいかなる方法で製造されたものでもよい。モノクローナル抗体は、基本的には公知技術を使用し、感作抗原を通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作成できる。

また、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた遺伝子組換え型抗体を用いることができる(例えば、Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照)。具体的には、ハイブリドーマの mRNA から逆転写酵素を用いて抗体の可変領域(V 領域)の cDNA を合成する。目的とする抗体の V 領域をコードする DNA が得られれば、これを所望の抗体定常領域(C 領域)をコードする DNA と連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体の V 領域をコードする DNA を、抗体 C 領域の DNA を含む発現ベクターへ組み込んでもよい。発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクター
20 に組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ(Chimeric)抗体、ヒト型化(Humanized)抗体などを使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用

いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体であり、マウス抗体の可変領域をコードする DNA をヒト抗体の定常領域をコードする DNA と連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し產生させることにより得ることができる。

ヒト型化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体の CDR とヒト抗体のフレームワーク領域 (framework region ; FR) を連結するように設計した DNA 配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドから PCR 法により合成する。得られた DNA をヒト抗体定常領域をコードする DNA と連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し產生させることにより得られる (欧州特許出願公開番号 EP 239400 、国際特許出願公開番号 WO 96/02576 参照) 。 CDR を介して連結されるヒト抗体の FR は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856) 。

このような再構成ヒト型化抗体としてヒト型化抗 IL-6 レセプター抗体 (h PM-1) が好ましく例示される (国際特許出願公開番号 WO 92-19759 を参照) 。また、ヒト型化抗 HM1.24 抗原モノクローナル抗体 (国際特許出願公開番号 WO 98-14580 を参照) 、ヒト型化抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体 (抗 PTHrP 抗体) (国際特許出願公開番号 WO 98-13388 を参照) 、ヒト型化抗組織因子抗体 (国際特許出願公開番号 WO 99-51743 を参照) など本発明で使用する好ましい抗体である。

また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球を in vitro で所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えば U266 と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト

抗体を得ることもできる（特公平 1-59878 参照）。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる（国際特許出願公開番号 WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735 参照）。

- 5 さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードする DNA 配列を決定することができる。
- 10 抗原に結合する scFv の DNA 配列が明らかになれば、当該配列に基づいて適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に衆知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388 を参考にすることができる。

さらに、トランスジェニック動物等によって作製されたヒト抗体も好ましい。

- 15 さらに、抗体には Fab, (Fab')₂, Fc, Fc', Fd などの抗体断片や、1 価又は 2 価以上の一本鎖抗体（scFV）などの再構成したものも含む。

本発明では、生理活性タンパク質含有試料とは、生体由来タンパク質であるか、あるいは組換えタンパク質であるかを問わず、いかなるタンパク質を含む試料であってもよく、好ましくは、培養により得られた生理活性タンパク質を含む CH

20 O 細胞などの哺乳動物細胞の培養培地、あるいはこれに部分的精製などの一定の処理を施したものをいう。

- 生理活性タンパク質溶液製剤は、生理活性タンパク質の他に、所望によりさらに界面活性剤、アミノ酸などの安定化剤、希釈剤、溶解補助剤、賦形剤、pH 調整剤、無痛化剤、緩衝剤、含硫還元剤、酸化防止剤等を含有してもよい。これら
- 25 の成分を通常使用される緩衝液中に溶解して製造される。

生理活性タンパク質溶液製剤は、通常密封、滅菌されたプラスチック又はガラス製のバイアル、アンプル、注射器のような規定容量の形状の容器、ならびに瓶のような大容量の形状の容器で供給される。本発明の安定化方法は、これらのいずれの容器形状の溶液製剤にも使用できる。好ましいのはプレフィルドシリンジ

の溶液製剤である。

その他には、バイアルも好ましく例示される。

- 本発明では、生理活性タンパク質の溶液製剤を磁力線下に保存する。磁力線の発生装置は磁石、半導体プロセスで製造される磁気ヘッド、微小コイルを配列して電気を流す、などが挙げられるが、これに限定されない。安価で簡便であることから、磁石を溶液製剤の容器の周囲に配置して保存するのが好ましい。本発明の実施の1態様を図1に示す。磁石の形態や配置方向については特に限定されないが、包装形態を考慮するとシート状の磁石が好ましい。また、磁力線の強さが磁石表面からの距離に依存すること、シリンジ内の薬液ができるだけ均一になるようにということを考えると、シリンジ縦軸方向に直交してSNを配置するのが好ましい（図2参照）。磁力線発生装置は収納する生理活性タンパク質溶液製剤が磁力線下におかれるように1又は複数配置する。図2に示すように、1つのシート状磁石上にシリンジを配置してもよいし、あるいは図3に示すように2つのシート状磁石の間にシリンジを配置してもよい。
- あるいはまた、図4に示すように、シート状の磁石上にバイアルを配置してもよい。

- 生理活性タンパク質溶液製剤及び磁石の配置は、溶液製剤が磁力線下に保存されるものであれば何れの配置であってもよい。磁石の磁化の向きは、溶液製剤が磁力線下に保存されるものであれば何れの向きであってもよい。例えば図1では、磁石の上面をN極、下面をS極とすることもでき、上面をS極、下面をN極とすることもできる。図2及び4では、シリンジ又はバイアルに接する面をN極としてもよく、S極としてもよい。図3では、シリンジに接する2つの面の一方をN極、もう一方をS極とすることもでき、両方を同じ極にすることもできる。

- 磁束密度（磁力線の強度）は、1ミリテスラ以上、好ましくは1～450ミリテスラ、さらに好ましくは1～150ミリテスラである。

本発明はさらに、磁力線発生装置を備えた生理活性タンパク質溶液製剤の収納容器を提供する。本発明の収納容器の形状、材質は特に限定されないが、内部に上述した磁力線の発生装置並びに溶液製剤の収納部位を備えている。収納容器は収納ボックス、冷蔵庫、コンテナなどであってよい。

本発明はさらに、磁力線下にタンパク質バルク溶液を保存することを含むタンパク質バルク溶液の安定化方法を提供する。また、磁力線下に保存したタンパク質バルク溶液から安定化タンパク質製剤を調製することができる。安定化タンパク質製剤は溶液製剤であっても、凍結乾燥製剤であってもよい。

- 5 本発明の方法で保存した生理活性タンパク質溶液製剤は長期保存後も会合体の生成を抑制することが確認された。例えば、非磁力線下で 40℃・2 週間及び 1 ヶ月間加速したエリスロポエチン（EPO）注射剤（750IU）について純度試験（SDS-PAGE 法）及び定量試験（液体クロマトグラフ法）にて評価した結果、純度試験において二量体の増加を認め、定量試験において EPO 含量の低下が確認された。
- 10 一方、約 100 ミリテスラの磁力線下で 40℃・2 週間及び 1 ヶ月間加速した EPO 注射剤（750IU）につき、純度試験（SDS-PAGE 法）及び定量試験（液体クロマトグラフ法）にて評価した結果、40℃・1 ヶ月加速品の純度試験において僅かな二量体の増加を認めたものの、その他はいずれの評価項目においても、未加速品と比べて変化を認めなかった。
- 15 本発明者らは特定の理論に拘束されるものではないが、本発明の作用機構を以下のように考えている。すなわち、一般的にタンパク質の会合化は、タンパク質分子の疎水性部位が、熱や容器表面への衝突等の何らかの影響によってタンパク質分子の立体構造の表面に出現し、疎水性部位が互いに結合し合うことにより起こると考えられている。従って、何らかの力で水溶液中のタンパク質を拘束できればタンパク質分子のランダムな衝突を抑制できると考えられる。本発明では、
- 20 水溶液中のタンパク質分子が強磁場の下で規則的に配列することにより、分子が拘束され、ランダムな衝突が抑制され、その結果疎水性部位の結合による会合化が抑制されたものと考えられる。

- 25 従って、本発明の方法及び収納容器は、従来の安定化剤を添加して生理活性タンパク質製剤を安定化させるという発想とは全く異なる技術的思想に基づくものであり、簡便な方法で会合体の生成を抑制して長期保存が可能となる。本発明の方法及び収納容器を使用することにより、添加剤の使用量を少なくすることができる。

本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明の範囲はこれ

に限定されない。本発明の記載に基づき種々の変更、修飾が当業者には可能であり、これらの変更、修飾も本発明に含まれる。

実施例

5 実施例 1 : EPO製剤における効果

1) 試料

EPO注射用製剤(750IU) (シリンジ製剤、EPO濃度 1500IU/mL、容量 0.5 mL: 中外製薬製) を用いた。

2) 試験方法

- 10 EPO注射用製剤(750IU) に磁石(約 100 ミリテスラ) を取り付け(図 1 参照)、40℃恒温槽に 2 週間及び 1 ヶ月間保存した後に、評価を行った。図 1 において、シート状磁石の上面をN極とし、下面をS極とした。

また、非磁力線下(<1 ミリテスラ) において 40℃・2 週間及び 1 ヶ月間加速を行った試料及び未加速の試料を同時に評価し、未加速品に対するEPO含量の変化、二量体及びその他の類縁物質の含量変化を評価の指標とした。

15

3) 評価方法

3-1) 純度試験 (SDS-ゲル電気泳動法)

上述した各試料を試料溶液とする。試料溶液の 60 μ L を正確に取り、非還元系 Sample Buffer*1 を正確に 20 μ L 加え、50℃の温浴で 15 分間加熱する。加熱後、

20

泳動用試料および分子量マーカー*3 のそれぞれ 7.5 μ L につき、次の条件で電気泳動法により試験を行い、ウェスタンブロット法により検出する。

3-1-1) 電気泳動法

泳動装置: TEFCO 社製電気泳動装置

25

泳動ゲル: スラブゲル[グラジエント 8%-16%、15Well、厚さ 1.5mm、TEFCO 製]

泳動電流: 25mA/枚の一定電流

泳動時間: 約 1.5 時間

泳動 Buffer: 電気泳動用緩衝液*4

3-1-2) ウェスタンブロット法

泳動後、Transfer 緩衝液*5 10mL にゲルを浸し、30 分間平衡化する。次いで、転写装置の陽電極側に Transfer 緩衝液で浸したスポンジおよびろ紙 1 枚(ファーストトランスファーフィルターペーパー (20cm×10cm、ファルマシア製) を順にのせ、その上にあらかじめメタノールに約 30 秒間浸し、更に Transfer 緩衝液に 5 分間浸しておいたプロブロット膜*6 をのせる。更にその上にゲルを重ね、Transfer 緩衝液に浸したろ紙 1 枚およびスポンジをのせ、膜側を陽電極、ゲル側を陰電極にセットする。次の条件により、プロブロット膜への転写を行い、転写後抗 EPO ウサギ血清を用いてプロブロット膜を発色させる。

10 転写温度：25℃付近の一定温度

転写条件：電流 65±2mA、転写時間 120 分間

*1 非還元系 Sample Buffer：エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 74.48mg 及びラウリル硫酸ナトリウム 5.0g を Tris-HCl 溶液*7 50mL に溶かす。

15 *2 BPB 溶液：Tris-HCl 溶液 0.625mL、濃グリセリン 3.5mL 及びブロムフェノールブルー溶液 5mg を混和する。4℃で冷蔵保存する。

*3 分子量マーカー溶液：Prestained SDS-PAGE 標準溶液 (パイオラッド製又はこれに相当するもの) [Lysozyme (分子量：20900)、Soybean trypsin inhibitor、(同：29100)Carbonic anhydrase (同：35500)、Ovalbumin (同：50600)、Bovine serum albumin (同：83000)及び Phosphorylase B (同：101000)を含む]

*4 電気泳動用緩衝液：トリスヒドロキシメチルアミノメタン 3.0g 及びグリシン 14.4g を水 600mL に加え、これにラウリル硫酸ナトリウム 1.0g を加えて溶解した後、水を加えて 1000mL とする。

25 *5 Transfer 緩衝液：トリスヒドロキシメチルアミノメタン 6.0g 及びグリシン 28.8g を水 600mL に加え、これにメタノール 400mL を加えて溶解した後、水を加えて 2000mL とする。

*6 プロブロット膜：ポリビニリデンジフルオリドメンブランフィルター (8cm×8cm、アプライドバイオシステム製) 又はこれに相当するもの。

*7 Tris-HCl 溶液：トリスヒドロキシメチルアミノメタン 3.0g を水 30mL

に溶かし、1mol/L 塩酸試液を加えて pH6.8 に調整した後、水を加えて 100mL とする。4℃で冷蔵保存する。

3-2) 定量法 (液体クロマトグラフ法)

本品を試料溶液とし、EPO標準品に 0.05%ポリソルベート 20 水溶液を加えて 1500IU/mL としたものを標準溶液とする。

試料溶液及び標準溶液各 100μL を正確に量り、次の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行い、それぞれのEPOのピーク面積 A_T 及び A_S を測定する。次式により本品のEPO含量 (濃度: mg/mL) を求める。

EPO含量 (mg/mL)

$$10 \quad = \text{EPO標準品のEPOポリペプチド相当量 (mg/mL)} \times \frac{A_T}{A_S}$$

A_T : 試料溶液のEPOのピーク面積

A_S : 標準溶液のEPOのピーク面積

液体クロマトグラフの操作条件

15 検出器: 紫外吸光光度計 (測定波長: 214nm)

カラム: 内径 5mm、長さ 25cm のステンレス管にブチルシリル化した約 5μm のシリカゲルを充填する。(VYDAC 214TP54、セパレーションズグループ製)

カラム温度: 室温

移動相: 次の A 液及び B 液を用い、2 液の混合グラジエントを行う。

20 A 液: 水・アセトニトリル・トリフルオロ酢酸混液 (400:100:1)

B 液: アセトニトリル・水・トリフルオロ酢酸混液 (400:100:1)

グラジエント操作: B 液濃度 35%でカラムを平衡化した後、試料溶液及び標準溶液を注入する。5 分間 B 液濃度 35%に保った後、15 分間で B 液濃度 100% になるように線形グラジエントを行う。その後、2 分間これを保持する。

25 流量: EPOの保持時間が約 18 分になるように調整する。

4) 結果

4-1) 純度試験 (SDS-PAGE 法)

磁力線下で 40℃・2 週間及び 1 ヶ月間加速した E P O 注射用製剤 (750IU) につき、SDS-PAGE 法にて評価した。

その結果、非磁力線下における 40℃・2 週間加速品では二量体の増加が認められたのに対し、磁力線下における 40℃・2 週間加速品では未加速品と比較して、

5 変化は認められなかった。

また、40℃・1 ヶ月間加速品については、磁力線下及び非磁力線下ともに僅かな二量体の増加を認めたものの、目視による量的な多少については判断することは困難であった。

10 4-2) 定量法 (液体クロマトグラフ法)

磁力線下で 40℃・2 週間及び 1 ヶ月間加速した E P O 注射用製剤 (750IU) につき、液体クロマトグラム法にて評価した結果を表 1 及び表 2 に示す。

E P O 含量を未加速品と比較した場合、非磁力線下における 40℃・2 週間加速品では含量低下を認め、残存率が 96% となった。また、非磁力線下における 40℃

15 -1 ヶ月間加速品では顕著な含量低下を認め、残存率が 93% となった。

一方、磁力線下 40℃・2 週間加速品では含量の変化はほとんど認めず、40℃・1 ヶ月間加速品においても、残存率 97% となり、試験法の精度 (併行精度 C.V.=1.6%) を考慮した時、何れの加速期間においても含量の変化は認められなかった。

20

表 1 40℃・2 週間加速品の E P O 残存率

	磁束密度	EPO濃度 (of label)	残存率 (%)
未加速品	<1mT	93.8%	100.0%
40℃-2週間	<1mT	89.7%	95.6%
40℃-2週間	100mT	93.7%	99.9%

表 2 40℃・1 ヶ月間加速品のエポエチン ベータ残存率

	磁束密度	EPO濃度 (of label)	残存率 (%)
未加速品	<1mT	93.9%	100.0%

40℃－1ヶ月	<1mT	87.5%	93.1%
40℃－1ヶ月	100mT	91.4%	97.3%

実施例 2 : G－C S F 溶液における効果

1) 試料調製

G－C S F 溶液（G－C S F 濃度 約 0.5mg/mL）をディスポーサブルフィルターにてろ過し、5mL ガラスバイアルに 1mL ずつ充填したものを被験試料とした。

2) 保存条件

被験試料を 30℃恒温槽内にて磁力線存在下（約 100 ミリテスラ*⁸）及び非磁力線下*⁹に保存した（図 4 参照）。図 4 において、シート状磁石のバイアルと接する面をN極とし、反対の面をS極とした。

* 8 テスラ (T) : 磁束密度単位、1 テスラ=10,000 ガウス (G)

* 9 非磁力線下 : 自然界における磁束密度（通常 1 ミリテスラ未満）とした。

3) 評価方法

被験試料を 30℃恒温槽にて 2 週間保存後、ゲルろ過クロマトグラフ法（n=3）にてG－C S F 会合体含量を測定した。

4) 結果

30℃2 週間保存後のG－C S F 会合体含量を表 3 に示す。

表 3 G－C S F 会合体生成挙動に与える磁力線の影響

保存条件	G－C S F 会合体含量	
	平均値	標準偏差
磁力線存在下	1.5%	0.04%
非磁力線下	2.3%	0.06%

上記の結果の通り、磁力線にはG－C S F 溶液の保存時における会合体の生成を抑制する効果が認められた。

請求の範囲

1. 磁力線下にタンパク質溶液製剤を保存することを含むタンパク質溶液製剤の安定化方法。
- 5 2. 磁束密度が1ミリテスラ以上である請求項1記載の方法。
3. タンパク質が生理活性タンパク質である請求項1又は2記載の方法。
4. 生理活性タンパク質が、抗体、酵素、サイトカイン、ホルモンから選択される請求項3記載の方法。
5. 生理活性タンパク質が造血因子である請求項4記載の方法。
- 10 6. 造血因子がエリスロポエチン又は顆粒球コロニー刺激因子である請求項5記載の方法。
7. 生理活性タンパク質が抗体である請求項4記載の方法。
8. タンパク質溶液製剤がプレフィルドシリンジである請求項1記載の方法。
9. 磁力線発生装置を備えたタンパク質溶液製剤の収納容器。
- 15 10. 磁力線発生装置が磁石である請求項9記載の収納容器。
11. 磁力線下にタンパク質含有溶液を保存することを含むタンパク質含有溶液の安定化方法。
12. タンパク質含有溶液がタンパク質製造バルク溶液である請求項11記載の方法。
- 20 13. 磁力線下に保存したタンパク質バルク製造溶液から調製した安定化タンパク質製剤。
14. 安定化タンパク質製剤が溶液製剤である請求項13記載の製剤。
15. 安定化タンパク質製剤が凍結乾燥製剤である請求項13記載の製剤。
16. 磁力線下にタンパク質溶液製剤を保存することを含むタンパク質溶液製剤の会合体生成抑制方法。
- 25 17. タンパク質溶液製剤の安定化のための磁力線発生装置の使用。

图1

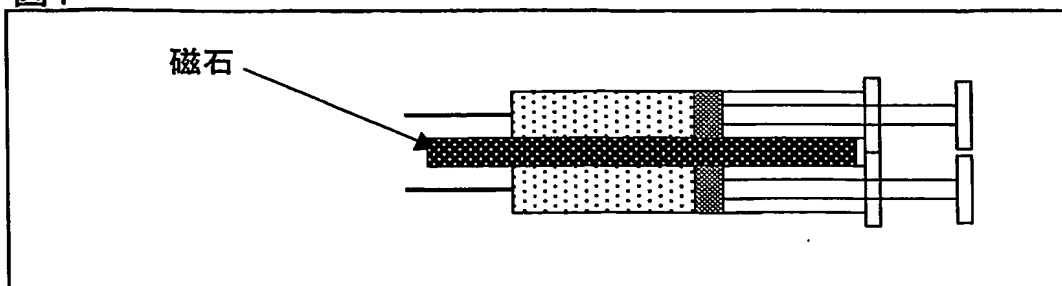


图2

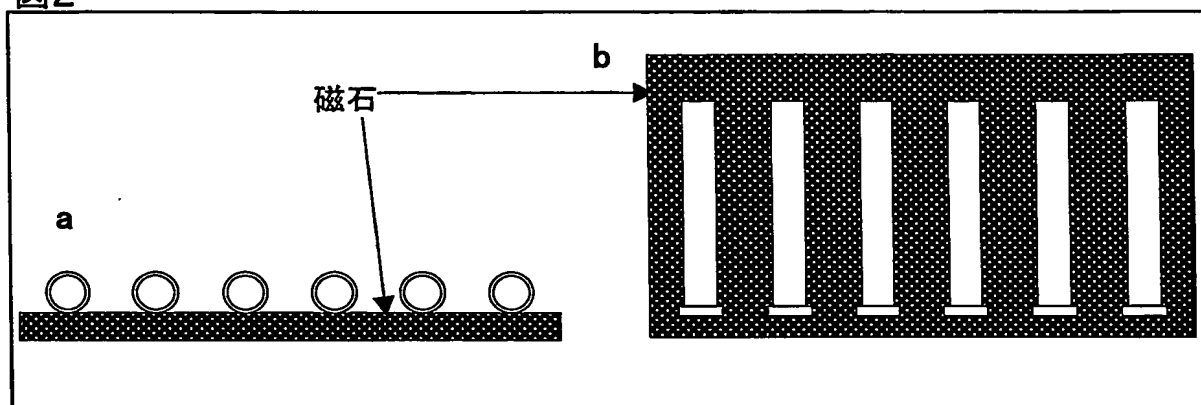


图3

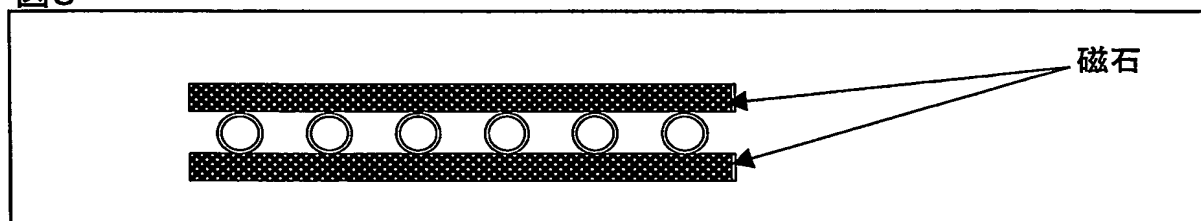
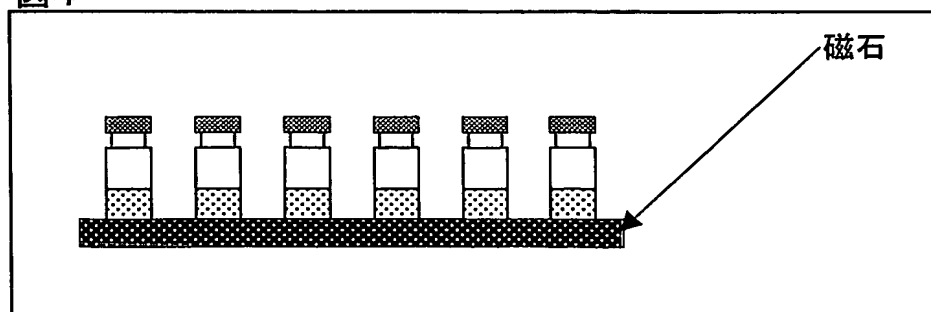


图4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10754

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/00, A61K9/08, A61J1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/00, A61K9/08, A61J1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 02/17957 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 07 March, 2002 (07.03.02), Particularly, Claims & EP 1329224 A1	13-15 1-12, 16, 17
X A	WO 01/17542 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 15 March, 2001 (15.03.01), Particularly, Claims & EP 1232753 A1 & JP 2001-521332 A	13-15 1-12, 16, 17
X A	WO 01/64241 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 07 September, 2001 (07.09.01), Particularly, Claims & EP 1260230 A1 & JP 2001-563138 A & US 2003/92622 A1	13-15 1-12, 16, 17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
19 November, 2003 (19.11.03)

Date of mailing of the international search report
09 December, 2003 (09.12.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10754

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 00/51629 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 08 September, 2000 (08.09.00), Particularly, Claims & JP 2000-247903 A & EP 1197221 A1	13-15 1-12,16,17
X A	EP 178665 A2 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 15 May, 1986 (15.05.86), Particularly, Claims & JP 61-97229 A & US 4806524 A	13-15 1-12,16,17
A	JP 2000-229815 A (Toshimitsu HATTORI), 22 August, 2000 (22.08.00), (Family: none)	1-17
A	JP 2001-340062 A (Kabushiki Kaisha Toyo Shin'yaku), 11 December, 2001 (11.12.01), (Family: none)	1-17
A	US 5584994 A (Toshimitsu HATTORI, Masaru OTA), 17 December, 1996 (17.12.96), & JP 8-197064 A & JP 8-197066 A & EP 713842 A3	1-17
A	JP 1-262988 A (Kabushiki KaishaShoko Kagaku. Kenkyusho), 19 October, 1989 (19.10.89), (Family: none)	1-17

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.¹ A61K38/00, A61K9/08, A61J1/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.¹ A61K38/00, A61K9/08, A61J1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 02/17957 A1 (中外製薬株式会社), 2002. 03.07, 特に、特許請求の範囲 & EP 1329224 A1	13-15 1-12, 16, 17
X A	WO 01/17542 A1 (中外製薬株式会社), 2001. 03.15, 特に、特許請求の範囲 & EP 1232753 A1 & JP 2001-521332 A	13-15 1-12, 16, 17
X A	WO 01/64241 A1 (中外製薬株式会社), 2001. 09.07, 特に、特許請求の範囲 & EP 1260230	13-15 1-12, 16, 17

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.11.03

国際調査報告の発送日

09.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 のぶよ



4C

9454

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	A1 & JP 2001-563138 A & US 2003/92622 A1	
X A	WO 00/51629 A1 (中外製薬株式会社), 2000. 09. 08, 特に、特許請求の範囲 & JP 2000-247903 A & EP 1197221 A1	13-15 1-12, 16, 17
X A	EP 178665 A2 (中外製薬株式会社), 1986. 05. 15, 特に、特許請求の範囲 & JP 61-97229 A & US 4806524 A	13-15 1-12, 16, 17
A	JP 2000-229815 A (服部利光), 2000. 08. 22 (ファミリーなし)	1-17
A	JP 2001-340062 A (株式会社東洋新薬), 2001. 12. 11 (ファミリーなし)	1-17
A	US 5584994 A (服部利光, 太田勝), 1996. 12. 17 & JP 8-197064 A & JP 8-197066 A & EP 713842 A3	1-17
A	JP 1-262988 A (株式会社祥光化学研究所), 1989. 10. 19 (ファミリーなし)	1-17